

E P

U S

特許協力条約

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[P C T 18条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H 1 - 1 0 2 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 4 5 1 7	国際出願日 (日.月.年) 0 6 . 0 7 . 0 0	優先日 (日.月.年) 0 8 . 0 7 . 9 9
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int C17 C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int C17 C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (J O I S)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SUZUKI, Y. et al, "Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library", Gene, 1997, Vol. 200, p. 149-156 (p. 150, 2. Materials and methods)	1-7
Y	WO, 94/08001, A1 (KANAGAWA ACAD. SCI&TECHNOLOGY) 14. 4月. 1994 (14. 04. 94) &EP, 625572, A1 &US, 5597713, A &JP, 6-153953, A	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03.10.00	国際調査報告の発送日 10.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9735

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	WO, 98/20122, A1 (INST PHYSICAL & CHEM RES) 14.5月.1998 (14.05.98) &EP, 990702, A1 &JP, 10-127291, A	1-7
Y	LU, X. et al, "Construction and quality of cDNA libraries prepared from cytoplasmic RNA not enriched in poly(A) RNA", Gene, 1988, Vol. 71, No. 1, p. 157-164 (p. 164, left column, 12~16 line)	1-7
A	CARNINGI, P. et al, "High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated Cap trapper", DNA Res., 1997, Vol. 4, No. 1, p. 61-66	1-7

RECEIVED

APR 01 2002

TECH CENTER 1600/2900

AT
Translation
10/01/2002

ATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H1-102PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/04517	International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09		
Applicant	HELIX RESEARCH INSTITUTE	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01)	Date of completion of this report 03 September 2001 (03.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04517

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

the international application as originally filed

the description:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.

filed together with the international application in computer readable form.

furnished subsequently to this Authority in written form.

furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____

the claims, Nos. _____

the drawings, sheets/fig. _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/04517

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Y. Suzuki et al, "Construction and characterization of a full-length enriched and a 5'-end-enriched cDNA library", Gene, 1997, Vol. 200, pp. 149-155

Document 2: X. Lu et al., "Construction and quality of cDNA libraries prepared from cytoplasmic RNA not enriched in poly(A)+ RNA", Gene, 1988, Vol. 71, No. 1, pp. 157-164

Claims 1-7

The inventions set forth in Claims 1-7 do not involve an inventive step in the light of Document 1 and Document 2.

Document 1 discloses a process for constructing a cDNA library enriched with 5' ends, wherein a polyA RNA sample is treated with an alkaline phosphatase to remove the 5'-terminal phosphate groups included in said RNA from non-full-length mRNA having said phosphate groups and treated with an acid pyrophosphatase to convert 5'-terminal CAP structures included in said RNA to phosphate groups in full-length mRNA having said CAP structures, and then the RNA sample is treated with RNA ligase to bind synthetic oligo-RNA (oligo-cap linker) to the 5' end of the mRNA wherein 5'-terminal CAP structures included in

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP 00/04517

said RNA sample have been converted into phosphate groups, with polyA RNA being selected from the treated RNA sample, followed by reverse transcription with the selected polyA RNA as a template and the synthetic oligo-RNA used in the preceding step, or a partial complementary oligonucleotide thereof and an oligo-dT adapter as a primer. It also mentions the use of bacterial alkaline phosphatase (BAP) as the alkaline phosphatase and tobacco acid pyrophosphatase (TAP) as the acid pyrophosphatase (Document 1, p. 150, 2. Materials and methods).

Document 2 discloses the use of total mRNA, without purification, as the starting material for constructing a cDNA library, and claims that this prevents degradation by RNase because there is a lot of competitive inhibition due to the large quantity of non-polyA RNA, and it is thus possible to construct a library including a high percentage of full-length cDNA (Document 2, p. 164, left column, lines 12-16).

Increasing the proportion of full-length cDNA in Document 1 is an obvious problem; therefore, a person skilled in the art could easily deduce using total DNA disclosed in Document 2 as the material in Document 1.

Determination of the optimum pH for the enzyme reactions is usual practice within the art; therefore, determination of the optimum pH for TAP treatment, considering the efficiency of the reaction, is within the ordinary competence of a person skilled in the art.

Moreover, once a cDNA library has been obtained, investigation of positions in the genome to specify starting points for transcription in the genome is common practice within the art; therefore, once a cDNA library has been constructed as described above, determination of nucleotide sequences of cDNA included in the cDNA library, comparison of said sequences with the nucleotide sequences of corresponding genome DNA and specification of

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP 00/04517

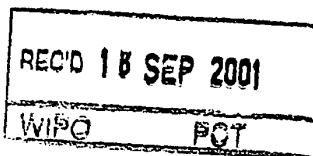
transcription starting points in the genome so as to isolate upstream genome DNA fragments are options available to a person skilled in the art.

Therefore, the inventions set forth in Claims 1-7 could be deduced easily by a person skilled in the art from disclosures in Documents 1 and 2.

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告



(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-102PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04517	国際出願日 (日.月.年) 06.07.00	優先日 (日.月.年) 08.07.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N15/09		
出願人（氏名又は名称） 株式会社ヘリックス研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.02.01	国際予備審査報告を作成した日 03.09.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 木村 順子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1. における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N) 請求の範囲 1 - 7 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (I S) 請求の範囲 _____ 有
請求の範囲 1 - 7 無

産業上の利用可能性 (I A) 請求の範囲 1 - 7 有
請求の範囲 _____ 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

引用文献1: SUZUKI, Y. et al. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. Gene, 1997, Vol. 200, pp. 149-156.

引用文献2: LU, X. et al. Construction and quality of cDNA libraries prepared from cytoplasmic RNA not enriched in poly(A)⁺RNA. Gene, 1988, Vol. 71, No. 1, pp. 157-164.

請求の範囲 1 - 7

請求の範囲 1 - 7 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び文献2より、進歩性を有しない。

引用文献1には、5'末端が多く含まれるcDNAライブラリーを作製する方法において、ポリARN試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該ARN試料に含まれる5'末端にリン酸基を有する不完全長mRNA分子の該リン酸基を除去し、さらに酸性ピロフオスファターゼで処理して、該ARN試料に含まれる5'末端にCAP構造を有する完全長mRNAの該CAP構造をリン酸基に変換すること、その後ARN試料をRNAリガーゼで処理して、該ARN試料に含まれる5'末端のCAP構造をリン酸基に変換されたmRNAの5'末端に合成オリゴRNA(オリゴキヤップリンカー)を結合させ、処理後のARN試料からポリARNを選択し、先の工程において使用した合成オリゴRNAもしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチド及びオリゴdTアダプターをプライマーとして、選択したポリARNを鋳型に逆転写反応を行うことが記載されている。そして、アルカリ性ホスファターゼとしては、細菌由来のアルカリ性ホスファターゼ(BAP)を、酸性ピロホスファターゼとしてはタバコ由来の酸性ピロホスファターゼ(TAP)を用いる旨が記載されている(引用文献1 p. 150, 2. Materials and Methods)

引用文献2には、cDNAライブラリーを作製する際に、mRNAを精製することなく、全RNAを出発材料として用いることが記載されており、これによって、大量のポリA以外のRNAが競合的に阻害しあい、mRNAがRNaseによって分解されるのを防ぐため、完全長cDNAを高率に含むライブラリーの作製が可能となる旨が記載されている(引用文献2 p. 164, 左欄第12~16行)

ここで、引用文献1において、完全長cDNAの割合を高めることは自明の課題と認められるから、引用文献1における材料として、引用文献2に記載された全DNAを用いることは当業者が容易に想到し得ることと認められる。

また、酵素反応の至適pHを求めるることは当業者が通常行うことであるから、TAP処理の至適pHを決定することも、当業者が反応の効率を考慮して適宜なし得ることと認められる。

補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第 V 欄の続き

そして、一般に、cDNAが得られた場合にゲノム上の位置を探索し、ゲノム上の転写開始点を特定することは、当業者において周知の方法であるから、上述のようにしてcDNAライブラリーを作製した場合に、cDNAライブラリーに含まれるcDNAの塩基配列を決定し、該配列と対応するゲノムDNAの塩基配列と比較し、ゲノム上の転写開始点を特定して上流のゲノムDNA断片を単離することは当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認められる。

従って、請求の範囲1～7に係る発明は、引用文献1及び2の記載に基いて、当業者が容易になし得たものと認められる。

Concise Explanation of the Japanese Reference

Suzuki, Y. and Sugano, S. "PCR: c) Oligo-capping method" in (Eds.) Inoue, J. and Senba, K. "cDNA Cloning", The Protocol Series, Experimental Medicine (Additional Volume), pp. 46-51:

The authors have developed a novel method for selectively cloning cDNA corresponding to mRNA intact at the 5'-end by conjugating a synthetic oligonucleotide to the 5'-end of mRNA.

Eukaryotic mRNA has a peculiar structure called the cap structure at its 5' end. The oligo-capping method is to specifically replace the cap structure of mRNA with an oligoribonucleotide. This method comprises three steps of enzyme reactions, i.e. dephosphorylation of 5'-truncated mRNA with bacterial alkaline phosphatase (BAP), decapping of 5'-intact mRNA with tobacco acid pyrophosphatase (TAP) and RNA ligation with RNA ligase. The RNA thus prepared can be used for cDNA synthesis by RT-PCR.

(Protocols)

1) BAP treatment: The following reaction solution are prepared for 5-10 μ g of poly A(+) RNA

ddH ₂ O	74.3 μ l
5x BAP buffer	20.0 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	2.7 μ l
<u>BAP (0.4 U/μl)</u>	<u>3.0 μl</u>
Total	100.0 μ l

Incubation for 30 min. at 37°C.

Phenol/chloroform extraction x2

Ethanol precipitation

2) TAP treatment (decapping)

ddH ₂ O (+RNA)	75.3 μ l
5x TAP buffer	20.0 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	2.7 μ l
<u>BAP (0.4 U/μl)</u>	<u>2.0 μl</u>

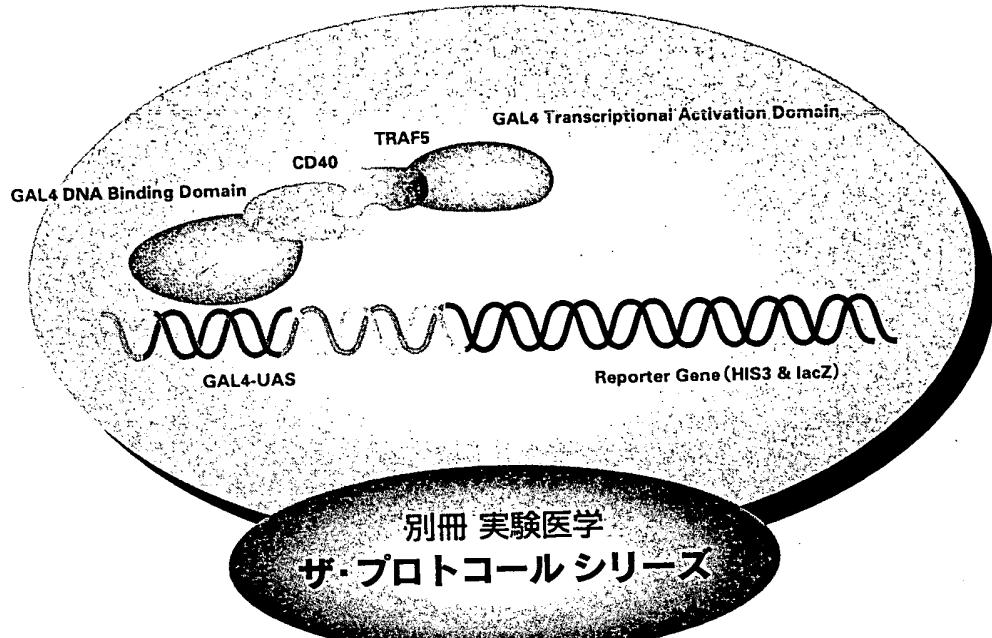
Total 100.0 μ l
Incubation for 30 min. at 37°C.
Phenol/chloroform extraction x2
Ethanol precipitation

3) RNA ligation

ddH ₂ O	6.4 μ l
Synthetic oligo-RNA (100 ng/ μ l)	4 μ l
10x Ligation buffer	10.0 μ l
25 mM MgCl ₂	20.0 μ l
24 mM ATP	2.1 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	2.5 μ l
T4 RNA ligase (50 U/ μ l)	5 μ l
<u>50% PEG8000</u>	<u>50.0 μl</u>
Total	100.0 μ l

Incubation for 3 hours at 16°C
Phenol/chloroform extraction x2
Ethanol precipitation

2657-33345



別冊 実験医学
ザ・プロトコールシリーズ

CDNAクローニング

編集／井上純一郎 仙波憲太郎

羊土社

6032559-8

① PCR 法

c) オリゴキャッピング法

鈴木 穂 菅野純夫

はじめに

オリゴキャッピング法は、mRNA の 5' 末端に対応する cDNA をクローニングする方法です

塩基配列の相同性や、タンパク質の活性を手がかりに、従来の手法により単離した cDNA が完全長であることは、むしろ稀である。得られたクローンには、mRNA の 5' 末端塩基配列が含まれていないことが多いため、単離した cDNA をプローブにライブライマーを再検索するか、合成プライマーを用いたプライマー extention 法や RACE 法によってできるだけ長い cDNA のクローニングを試みる必要があることが多い。しかし、これらの方法は原理的に、存在する最長の cDNA を分離する手法であるため、mRNA の 5' 末端が含まれていることが必ずしも保証されない。また、mRNA の転写開始部位が複数ある場合には、それを見逃すおそれがある。われわれは、mRNA の 5' 末端に合成オリゴを結合させることで、mRNA の 5' 末端に対応する cDNA のみをクローニングする方法を開発した。

真核細胞 mRNA の 5' 末端には、キャップ構造と呼ばれる特殊な構造が存在する。オリゴキャッピング法は、図 1 に示す 3 段階の酵素反応によって、キャップ構造を合成オリゴリボヌクレオチドに特異的に置換する方法である。この方法を用いることにより、5' 末端を含む mRNA のみを選択的に RT-PCR により増幅しクローニングすることができる。

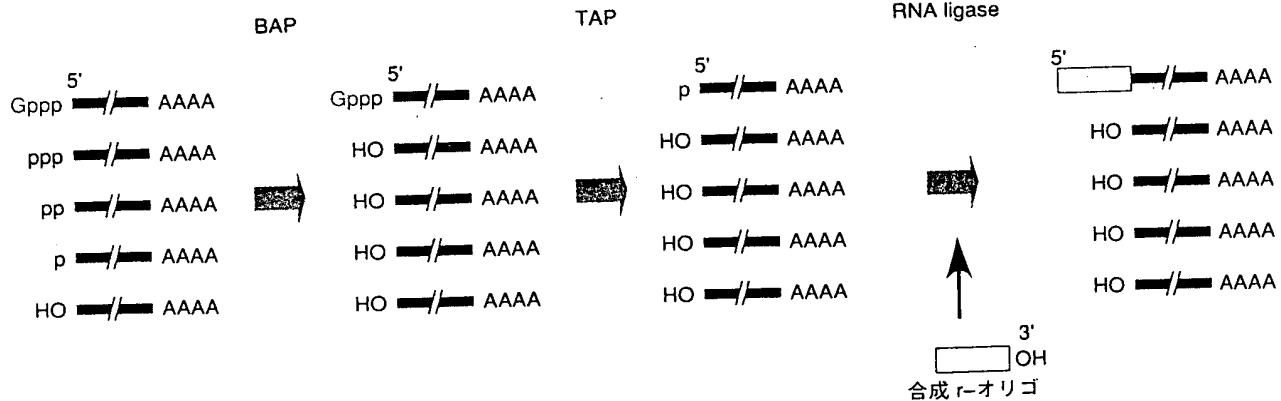


図 1 オリゴキャッピング法による mRNA の 5' 末端の標識
Gppp : キャップ構造, p : phosphate, OH : hydroxyl, AAAA : poly A

準備するもの

RNA に対し長時間また多段階にわたる酵素反応を行うため、試薬の調製は RNase free で行うことに特に留意する。

1) 器具・機械

- PCR 装置：すべての反応温度の制御に用いる。

2) 試薬

- bacterial alkaline phosphatase (BAP) : TaKaRa 2110
- RNase inhibitor (40 U/ μ l) : われわれは Promega 社のものを用いている。
- フェノール・クロロホルム (1 : 1)
- tobacco acid pyrophosphatase (TAP) : 文献 4 の方法で精製する。また和光純薬より入手する (TAP HG) ことも可能である。
- T 4 RNA ligase : TaKaRa 2050
- RTase (reverse transcriptase) : Superscript II (Gibco-BRL)
- PCR kit : われわれは PERKIN ELMER 社の GeneAmp PCR kit を用いている。

3) 試薬の調製

		(最終濃度)
· 5 × BAP バッファー		
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	250.0 μ l	(500 mM)
14 M 2-mercaptop ethanol	1.8 μ l	(50 mM)
ddH ₂ O	248.2 μ l	
total	500.0 μ l	
· 5 × TAP バッファー		
0.5 M Sodium acetate (pH 5.5)	250.0 μ l	(250 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	5 μ l	(5 mM)
14 M 2-mercaptop ethanol	1.8 μ l	(50 mM)
ddH ₂ O	243.2 μ l	
total	500.0 μ l	
· 10 × ligation バッファー		
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	250.0 μ l	(500 mM)
14 M 2-mercaptop ethanol	3.6 μ l	(10 mM)
ddH ₂ O	246.4 μ l	
total	500.0 μ l	

プロトコール

1) BAP 処理

mRNA の 5'末端のリン酸基を水酸基にしよう

5 ~ 10 μ g の polyA⁺ RNA に対し、以下のように反応溶液を調製する

ddH ₂ O	74.3 μ l
5 × BAP バッファー	20.0 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	2.7 μ l
BAP (0.4 U/ μ l)	3.0 μ l
total	100.0 μ l

37 °C で 30 分間インキュベートする

↓
フェノール・クロロホルム抽出を2回繰り返す

↓
エタノール沈殿を行った後、70%エタノールで洗浄し乾燥する

2) TAP 処理

キャップ構造を外そう

得られた RNA に対し、以下のように反応溶液を調製する

ddH ₂ O (+RNA)	75.3 μ l
5 × TAP バッファー	20.0 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	2.7 μ l
TAP (20 U/ μ l)	2.0 μ l
total	100.0 μ l

↓
37°Cで30分間インキュベートする

↓
フェノール・クロロホルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿を行い、70%エタノールで洗浄し乾燥する

3) RNA ライゲーション

合成 RNA オリゴで標識しよう

BAP, TAP 処理した RNA に対し、以下のように反応溶液を調製する

ddH ₂ O	6.4 μ l
合成 RNA オリゴ (100 ng/ μ l)	4 μ l
10 × ligation バッファー	10.0 μ l
25 mM MgCl ₂	20.0 μ l
24 mM ATP	2.1 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	2.5 μ l
T 4 RNA ligase (50 U/ μ l)	5 μ l
50% PEG8000	50.0 μ l
total	100.0 μ l

↓
16°Cで3時間インキュベートする

↓
200 μ l の ddH₂O を加えフェノール・クロロホルム抽出を行う

↓
高塩濃度 (酢酸アンモニウムを最終濃度 2.5 M) でのエタノール沈殿を3回繰り返した
後、70%エタノールで洗浄し乾燥する

4) 第1鎖 cDNA の合成と錆型 RNA の除去

第1鎖 cDNA をつくろう

5'末端を合成オリゴで標識した mRNA の 1/4 ~ 1/2 を用い, oligo-dT あるいは目的とする mRNA の 5'末端近傍の既知の塩基配列をプライマーにして、第1鎖 cDNA 合成を行う

ddH ₂ O	21 μ l
プライマー (5 pmol/ μ l)	2 μ l
5 \times first strand バッファー (RTase 添付のもの)	10 μ l
0.1 M DTT	6 μ l
5 mM dNTP	8 μ l
RNase inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l
RTase (Superscript II)	2 μ l
total	50 μ l

↓

50 μ l の ddH₂O を加えフェノール・クロロホルム抽出を行う

↓

2 μ l の 0.5 M EDTA を加える

↓

15 μ l の 0.1 M NaOH を加え、65 °C で 1 時間インキュベートする

↓

20 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加える

↓

高塩濃度 (酢酸アンモニウムを最終濃度 2.5 M) でのエタノール沈殿を 2 回繰り返した後、70 % エタノールで洗浄し乾燥する

5) PCR

目的の cDNA を増幅しよう

5'末端の標識に使用した 合成 r-オリゴ に対応する 5'側プライマーと、既知の塩基配列に制限酵素部位を付加した 3'側プライマーを用い PCR を行う

ddH ₂ O	52.4 μ l
プライマー (10 pmol/ μ l)	各 1.6 μ l
3.3 \times バッファー (kit に添付のもの)	30.0 μ l
25 M Mg (OAc) ₂	4.4 μ l
2.5 mM dNTP	8.0 μ l
DNA polymerase	2.0 μ l
total	100.0 μ l

↓

サイクル数、PCR のアニーリング温度は、目的とする遺伝子の発現量、および設計した PCR プライマーの T_m に合わせて設定する

■ プロトコールの Point

- ①BAP の活性が残っていると次の TAP 処理で完全長 mRNA の 5'末端からもリン酸基が除去されてしまうため、フェノール・クロロホルム抽出を 2 回行って、BAP を完全に除く。
- ②アンモニウムイオンは、T 4 RNA ligase の活性を阻害するため、ライゲーション反応の前のエタノール沈殿には酢酸アンモニウムを使用しない。
- ③アルカリ加水分解により鋸型 mRNA を除去し、PCR におけるランダムプライミングを抑える。
- ④PCR には第 1 鎮 cDNA の約 1/20 を用いる。また、5', 3' 側プライマー（-）のネガティブコントロールを必ず置くようにする。1 回の PCR で予想される塩基長のバンドが得られなかったときは、PCR 産物を鋸型に、ネスティドプライマーを用いて、2 回目の PCR を行う。また、発現量の少ないことが予想される遺伝子に対しては、適宜、サザンブロッティングおよびコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを併用する。
- ⑤5' 側プライマーは、合成オリゴの 3' 末端より数塩基上流に設定し、合成オリゴ由来の塩基配列を PCR 産物中に確認できるようにする。また、3' 側プライマーは、ネスティドプライマー、コロニーハイブリダイゼーションが必要となる可能性を考慮して、5' 末端に近づけ過ぎないよう設定する。



実験例

ヒト培養細胞（SK-N-MC）から polyA⁺ RNA を精製し、オリゴキャッピング法により、mRNA の 5' 末端を標識した。次に oligo-dT をプライマーとして第 1 鎮 cDNA 合成を行った。得られた第 1 鎮 cDNA を用いて、オリゴキャッピングした合成オリゴに対応するプライマー（A）とヒトタンパク質鎖延長因子 1- α （EF 1- α ）に特異的な 2 種類のプライマー（B, C）の組み合わせで PCR を行った。結果を図 2 に示す。

予想される塩基長の cDNA 断片をクローニングし塩基配列を決定したところ、21 クローン中 11 クローンが報告されている転写開始点と一致し、1 ~ 6 塩基長いものが 6 クローン、2 ~ 3 塩基短いものが 3 クローン確認され、転写開始点が複数あると考えるとそのすべてが、完全長 mRNA に由来するクローンであると考えられた（図 3）。

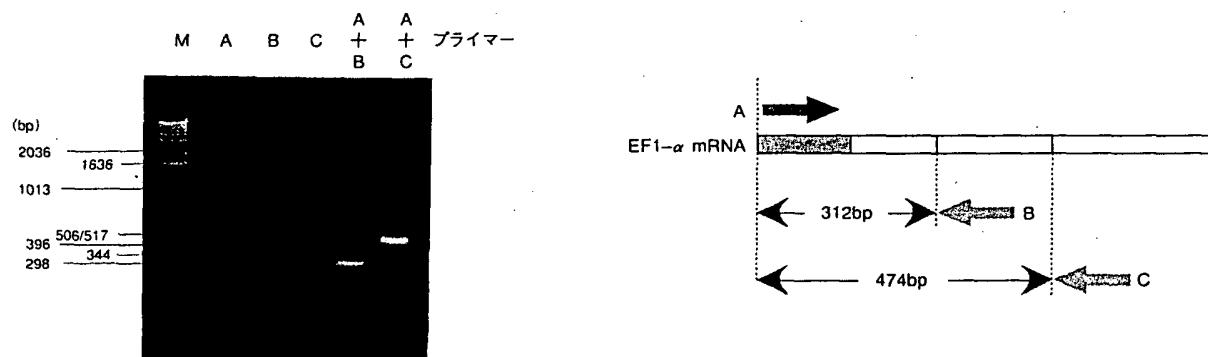


図 2 EF1- α mRNA の 5' 末端の増幅

合成オリゴ	Reported 5' end	↓	EF1- α cDNA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CTTTTT	CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA	
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CTTTTT	CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA	
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CTTTTT	CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA	
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CTTTTT	CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA	
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CTTTTT	CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA	
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CTTT	CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA
GAGCACTGTTGGCCTACTGG		CGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACA	

図3 EF1- α mRNA の 5'末端の構造

参考文献

- 1) Maruyama, K. & Sugano, S. : Gene, 138 : 171-174, 1994
- 2) 丸山和夫, 菅野純夫: 実験医学, 11 : 2491-2495, 1993
- 3) 鈴木 穣, 菅野純夫: タンパク質核酸酵素 臨時増刊, 「PCR 法最前線」(関谷剛男, 藤永慧 編), 41 : 603-607, 1996
- 4) Shinshi, H. et al. : Biochemistry, 15 : 2185-2190, 1976
- 5) Frohman, M. A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 8998-9002, 1988